на грызущих вредителей хлопчатника.— В кн. : Физиология и токсикология насекомых — вредителей хлопчатника.— Ташкент : Фан, 1970.— 69 с.
Ижевский С. С. Некоторые свойства карбогидраз кишечника колорадского жука.— Биол. науки, 1973, № 9, с. 37.
Лаппа Н. В., Нагорная И. М., Анохина В. П. Влияние боверина и его смеси с пониженными нормами инсектицида на карбогидразы кишечника капустной совки.— В кн.: Патология членистоногих и биологические средства борьбы с вредными организмами. Киев : Изд-во Киев. ун-та, 1974, с. 108—110.
Нагорна І. М., Лаппа Н. В., Гораль В. М., Анохіна В. П. Активність тканевих протеаз яблуневої плодожерки при мікозі.— В кн. Третій Український біохімічний з'їзд, серпень 1977. Донецьк, 1977, с. 234.
Филиппович Ю. Б., Минина Н. И. Амилаза в тканях тутового шелкопряда Bombyx mori.— В кн.: Вопросы экологической физиологии беспозвоночных. М. : Наука, 1974, с. 213—218.
Цибульска А. И. Патологические изменения в организме колорадского жука, вызванные грибом Beauveria bassiana (Bals) Vuill.— В кн.: Патогенные микроорганизмы вредителей растений. Рига : Зинатне, 1972, с. 36—37.
Eguchi M., Iwamoto A. Alkaline proteases in the midgut tissue and digestive fluid of the silkworm Bombyx mori.— Insect Biochem., 1976, 6, p. 491—496.
Pant R., Morris J. Proteolytic and amilolytic activity in Philosamia ricini (Eri silkworm) during development.— Indian J. Biochem., 1969, 6, N 3, p. 156.
Rensuke K. Нихон сансигаку дзасси.— J. Sericult Sci Jap. 1980, 49, N 2, p. 124—132.
Terra W. R., Ferreir C., de Bianchi A. G. Distribution of digestive enzymes among the endo- and ectoperitrophic spaces and midgut cells of Rynchosciara and its physiological significance.— J. Insect Physiol., 1979, 25, N 6, p. 487—494.

Украинский н.-и. институт
защиты растений

Поступила в редакцию
2.IV 1981 г.

УДК 595.787:577.152

Т. Ф. Галанова, Н. М. Деревянко, Р. И. Шведова

ИЗУЧЕНИЕ ГИДРОЛАЗ В ПРОЦЕССЕ МЕТАМОРФОЗА НЕПАРНОГО ШЕЛКОПРЯДА

При изучении экологических особенностей нижнеднепровской популяции непарного шелкопряда выявлено существование внутрипопуляционного полиморфизма по типу окраски гусениц (Колыбин, Зелинская, 1969). В результате исследований установлено также, что тип окраски гусениц является наследуемым признаком (Деревянко, 1980). Причем соотношение «черных» и «серых» гусениц при различной численности популяции закономерно изменяется в зависимости от фазы градации численности. Вероятно, в популяции происходит автоматический отбор особей гетерозиготных или двух форм (гетеро- и гомозиготных) по окраске, отличающихся различными направлениями векторов отбора в разные сезоны года. Следовательно, более глубокое исследование фенотипов непарного шелкопряда по окраске даст возможность изучить те процессы, которые определяют внутрипопуляционную изменчивость и проявляются в структуре популяции, функция которой выражается в динамике ее численности. Поэтому исследование комплекса гидролитических ферментов пищеварения у гусениц непарного шелкопряда явится одним из подходов более глубокого изучения дискретности фенотипов в популяции, поскольку биохимический полиморфизм гидролаз у разных фенотипов насекомого проявляется уже на стадии яйца.

Материал и методы. Объектом исследования служили гусеницы непарного шелкопряда нижнеднепровской популяции I и V возрастов (серый и черный фенотипы по признаку окраски), приуроченные к питанию листьями дуба. В качестве препарата ферментов использовали супернатант, полученный путем центрифугирования на холоде при 6 тыс. об/мин гомогената из 10 гусениц I возраста, а также средней кишки одной гусеницы V возраста в 0,2 мл 0,005 М трис-глицинового буфера pH 8,3.

Ферменты фракционировали в 7,5%-ном полиакриламидном геле методом диск-электрофореза в модификации Филипповича и Щеголевой (1967). На каждую колонку наносили по 250—300 γ белка. Электрофорез проводили при 4 °С в течение 2,5—3 часов. Ферменты выявляли непосредственно на гелевых колонках сразу после окончания электрофореза, используя инкубационные смеси следующих составов. Щелочная фосфатаза (КФ 3.1.3.1): 6,0 мг нафтол-AS-BS-фосфата; 0,2 мл диметилсульфокси-

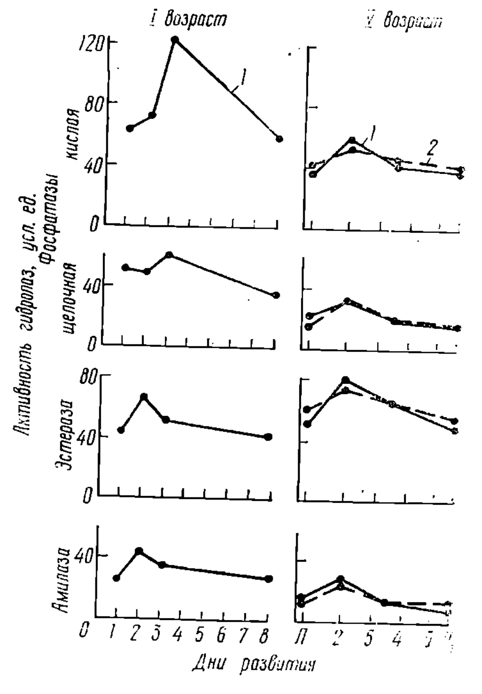
да; 16,0 мл 0,2 М трис-HCl буфера pH 7,4; время инкубации 20 мин при 37° С. Кислая фосфатаза (КФ 3.1.3.2): 4,0 мг α-нафтилфосфата; 16,0 мл 0,2 М ацетатного буфера pH 4,8; время инкубации 20 мин при 37 °С. Эстераза: 10 мг α-нафтилацетата, несколько капель 50%-ного ацетона; 16,0 мл 0,2 М трис-HCl буфера pH 7,4; время инкубации 15 мин при комнатной температуре. В качестве красителя для этих ферментов использовали 0,2%-ный водный раствор прочного синего В. Амилаза: 16,0 мл 0,2 М ацетатного буфера pH 5,6; время инкубации 60 мин при 37 °С; краситель 0,3% J_2 в 3% KJ.

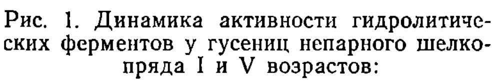
Сканирование ферментов проводили на денситометре, сделанном в отделе на базе ФЕК-56 М. Активность ферментов выражали в условных единицах, рассчитанных по формуле Симпсона. Расположение фракций на фореграммах идентифицировали по величине относительной электрофоретической подвижности (ОЭП).

Все опыты проведены в 3—4 биологических повторностях и 2 аналитических вариантах. Числовые значения активностей и ОЭП обработаны статистически (Ойвин, 1960).

Результаты и обсуждение. Исследована активность и выявлена динамика комплекса гидролитических ферментов у питавшихся листьями дуба гусениц I и V возрастов по дням развития. Данные рис. 1 показывают, что у гусениц I возраста максимальная активность эстеразы и амилазы выявлена на 2-й, а кислой и щелочной фосфатаз — на 3-й день развития насекомого в этом возрасте. На 8-и день, когда гусеница линяет на следующий возраст, активность всех исследованных ферментов снижалась. У гусениц V возраста активность этих гидролаз была наивысшей на 2-й день развития и снижалась к моменту линьки на следующий возраст.

На фореграммах кислая и щелочная фосфатазы у гусениц I возраста (рис. 2, *А*) представлены в виде 1—2 форм, расположенных в зоне средних значений ОЭП. У гусениц V возраста (рис. 2, *Б*, *В*) кроме уже названных форм на 5-й день развития обнаруживается и 3-я множественная форма ферментов в той же области подвижности. Эстераза расположена на фореграммах в зоне средней и малой ОЭП. У гусениц I возраста она представлена 3—4 множественными формами, у особей V возраста серого типа окраски обнаружены 4—6, у черного фенотипа 5—7 множественных форм. Наибольшая множественность форм эстеразы отмечена у гусениц обоих возрастов на 2-й день развития в каждом возрасте. Расположение амилазы на фореграммах у гусениц I и V возрастов варьирует. В частности, у гусениц I возраста в 1-й день фермент представлен в виде одной быстродвижущейся полосы, а начиная со 2 дня и вплоть до момента линьки — двумя формами, одна из которых расположена в зоне малой ОЭП, тогда как другая в зависимости от сроков развития гусениц меняет свое положение, проявляясь вначале в зоне средней, а затем только в зоне большой ОЭП. Амилаза у гусениц V возраста обнаруживается только в зоне малой ОЭП.




Рис. 1. Динамика активности гидролитических ферментов у гусениц непарного шелкопряда I и V возрастов:
1 — гусеницы серого фенотипа; *2* — гусеницы черного фенотипа; *Л—Л*$_1$ — линька.

На протяжении метаморфоза насекомого только личиночная стадия является питающейся. Именно в этот период наблюдается рост и накопление в организме запасных питательных веществ, которые, с одной стороны, должны способствовать нормальному переходу особи в следующий возраст, а с другой — должны будут поддерживать жизнеспособность куколки, бабочки и яйца, т. е. стадий развития насе-

комого, осуществляемых без потребления пищи. Это, естественно, не может не сказаться на активности ферментов, принимающих участие в пищеварении насекомого.

Снижение активности гидролаз в периоды линек, наблюдаемое, согласно нашим данным, у гусениц непарного шелкопряда, и у тутового шелкопряда (Минина, Филиппович, 1974), коррелирует с понижением в теле гусениц в этот момент содержания гликогена и растворимых углеводов (Carstens, Stoch, 1980), а также липидов (Pant Kumar, 1979).

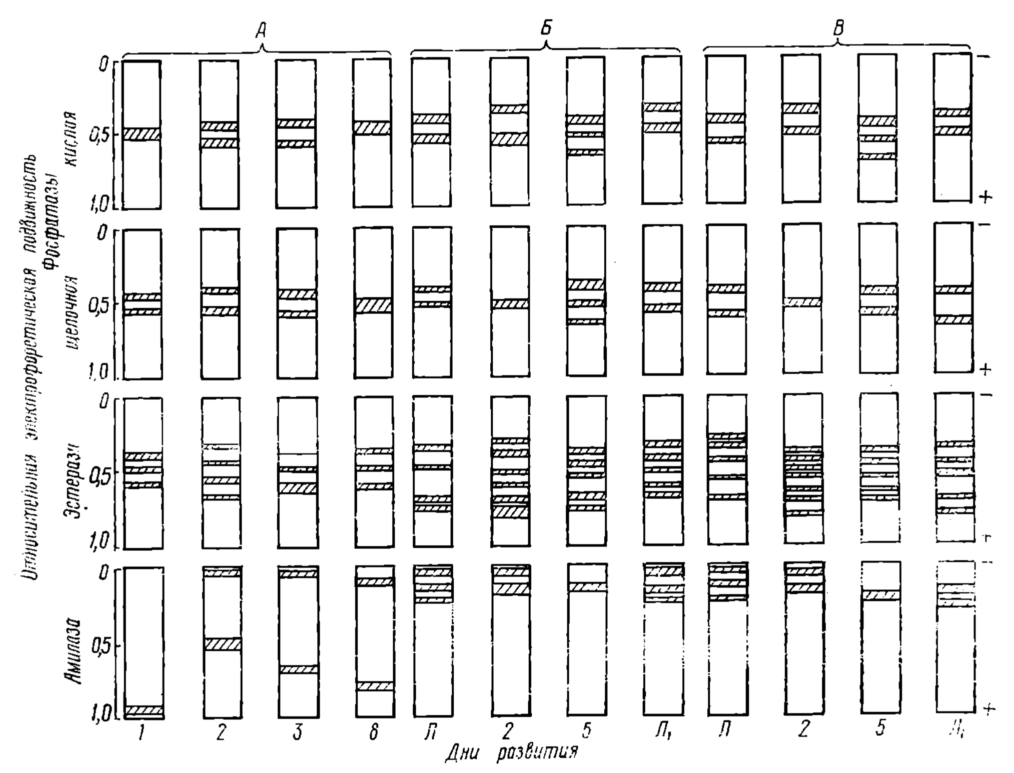


Рис. 2. Схема расположения ферментов у гусениц непарного шелкопряда:
А — I возраст серого фенотипа дубовой микропопуляции; Б — V возраст серого фенотипа; В — V возраст черного фенотипа; Л — линька с IV на V возраст; Л₁ — линька с V на VI возраст.

В периоды роста гусениц, наоборот, активность ферментов пищеварения повышается, особенно в начале роста, что объясняется потреблением большого количества пищи с необходимыми для жизнедеятельности веществами. Эти вещества, в частности, подвергаются прямому окислению (Смолин, 1953) и используются гусеницами младших возрастов для локомоторной деятельности (Pant, Kumar, 1979), а также превращаются в липиды, особенно в первые дни каждого возраста (Woodring, e. a., 1977), откладывающиеся у гусениц старших возрастов в качестве запасных питательных веществ. Этим, вероятно, можно объяснить повышение активности амилазы и фосфатаз, принимающих участие в утилизации углеводов, у гусениц непарного шелкопряда в первые дни каждого исследованного возраста. Кроме того, варьирование активности фосфатаз коррелирует с обменом фосфора, что было доказано с помощью использования меченого фосфора (Демяновский, Русакова, 1957).

Для личиночной стадии развития насекомого характерна определенная цикличность в проявлении активности гидролитических ферментов. У гусениц непарного шелкопряда от I (начального) до V и VI (в зависимости от пола особи) возрастов, завершающих стадию гусеницы, наблюдается снижение активности кислой и щелочной фосфатаз, что показано и для гусениц тутового шелкопряда (Минина, Филиппович, 1974). Активность эстеразы, как и количество форм фермента, наоборот, с возрастом гусениц непарного шелкопряда повышалась, что также установлено для тутового (Минина, Филиппович, 1974). По мере завершения личиночной стадии развития у многих насекомых повышается амилолитическая активность (Кутузова, 1977), однако

у гусениц непарного шелкопряда мы наблюдали некоторое снижение активности этого фермента.

Варьирование активности ферментов пищеварения на протяжении личиночной стадии развития насекомого находится в тесной связи с химическим составом листа. Во время вегетации химический состав листьев варьирует: в молодых листьях дуба содержится значительное количество белка и азотистых веществ, тогда как в летнем листе содержание белка и азотистых веществ уменьшается при одновременном повышении содержания крахмала, клетчатки, растворимых сахаров и жиров (Эдельман, 1953). Повышение содержания липидов в теле гусениц непарного шелкопряда с 5,8% в I возрасте до 20,6% у гусениц V возраста (Эдельман, 1953) коррелирует с полученными нами данными о повышении у гусениц вредителя старших возрастов активности эстеразы, принимающей участие в расщеплении липидов. Более того, повышение активности этого фермента у гусениц непарного шелкопряда старших возрастов связано с активацией находившихся ранее в форме зимогенов новых форм эстеразы (Eguchi, 1965).

Величина активности гидролаз у гусениц серого и черного фенотипов старших возрастов идентична, однако количество форм ферментов, выявляемых на фореграмме, варьирует. Множественность форм эстераз (рис. 2, *Б* и 2, *В*), присущая гусеницам непарного шелкопряда черного типа окраски, по сравнению с таковой, выявленной у особей, относящихся к серому фенотипу, свидетельствует о структурной неоднородности популяции насекомого, которая, по нашим данным, проявляется уже на стадии яйца и сохраняется не только в периоды личиночного развития, но, вероятно, и в течение всей жизни особей непарного шелкопряда.

Деревянко Н. М. Полиморфизм белков непарного шелкопряда в связи с феноструктурой популяции.— В кн.: Роль дендрофильных насекомых в таежных экосистемах. Тез. докл. Всесоюз. конф. 15—17 апр. 1980 г., Дивногорск. Красноярск, 1980, с. 42—43.

Демяновский С. Я., Русакова Н. С. Фосфорный обмен в организме дубового шелкопряда Antherea pernyi G.— Учен. зап./Моск. пед. ин-т им. В. И. Ленина, 1957, **98**, вып. 2, с. 59—64.

Колыбин В. А., Зелинская Л. М. Эколого-фаунистические особенности популяции непарного шелкопряда в Нижнем Приднепровье. Сообщ. I. Структура популяции.— Вестн. зоологии, 1969, № 3, с. 37—42.

Кутузова Н. М. Пищеварительные ферменты тутового шелкопряда в онтогенетическом и породно-гибридном аспектах. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1977.— 14 с.

Минина Н. И., Филиппович Ю. Б. Множественные формы ферментов и регуляция их активности в тканях тутового шелкопряда Bombyx mori L. в процессе онтогенеза.— В кн.: Биохимия насекомых. М. : МГПИ им. В. И. Ленина, 1974, вып. 16, с. 9—90.

Ойвин И. А. Статистическая обработка результатов экспериментальных исследований.— Патол. физиология и эксперим. терапия, 1960, **4**, с. 76—85.

Смолин А. Н. Материалы по изучению углеводного обмена у шелкопряда.— Учен. зап./Моск. пед. ин-т им. В. И. Ленина, 1953, **77**, вып. 7, с. 13—24.

Филиппович Ю. Б., Щеголева Л. И. Исследования растворимых белков тканей тутового шелкопряда методом электрофореза в полиакриламидном геле.— Докл. АН СССР, 1967, **174**, вып. 1, с. 240—242.

Эдельман Н. М. Влияние кормового режима на развитие непарного шелкопряда (Lymantria dispar L.) и тополевого листоеда (Melasoma populi L.).— Энтомол. обозр., 1953, **33**, № 1, с. 36—46.

Carstens S., Storch V. Beeinflussung der Ultrastruktur von Fettkörper und Mitteldarm des Staphyliniden Atheta fundi (Grav.) durch Umwelteinflüsse.— Zool. Jahrb. Alt. Anat. und Ontol. Tiere., 1980, **103**, N 1, S. 73—84.

Eguchi M., Sugimoto T. Changes in esterase of the silkworm, Bombyx mori L. during development.— Insect Physiol., 1965, **11**, N 8, p. 1145—1148.

Pant R., Kumar S. Metabolic fate of carbohydrates and lipids during moulting cycle of carbohydrates (Lepidoptera: Saturniidae).— Insect Biochem., 1979, **9**, N 6, p. 577—582.

Woodring J., Roe R., Clifford C. Relation of feeding, growth and metabolism to age in the larval, female house cricket.— J. Insect Physiol., 1977, **23**, N 2, p. 207—212.

Институт зоологии им. И. И. Шмальгаузена
АН УССР

Поступила в редакцию
16.IV 1981 г.